

# 脳のアミノ酸代謝 (VI)

## 発育中のニワトリ胚胎脳におけるトランス アミノーションについて

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

山 田 龍 雄

[昭和34年9月4日受稿]

### 序 論

発育期の脳については、生化学研究よりも解剖学的、組織学的研究が先んじていたが、今世紀初頭より漸く生化学研究も活発となり脳の生化学的構成の変化と、脳の発育及び分化とがどの様に関連づけられるかという可能性を取扱つて来た。

脳の生化学的研究の発展に伴つて脳アミノ酸代謝の特異性が論ぜられ立証せられてくるにつれ、発育及び分化の途上にある脳のアミノ酸代謝機構の解明は、発生生理学及び生化学における一つの中心課題となつて来た。

しかしながら個体の発育及び分化に際しておこなわれる脳の化学的事象を比較するための資料は限られたものである。就中アミノ酸代謝に重要な意義を占める酵素的構成及び機作に関する研究は、はなはだ少ないといわなければならない。私はこの様な見地から発生途上にある動物脳のアミノ酸代謝解明の一方法として、Braunstein ら<sup>1)2)</sup> に始まつた酵素的アミノ基転移反応を足がかりとして、白色レグホン種のニワトリをもちい、その胚胎より成熟ニワトリに至るまでの各時期における脳を、ペーパークロマトグラフィー法によりトランスアミノナーゼ活性を測定し、若干の知見をえたのでここに報告する。

### 実験方法

#### 1) 実験材料

実験にもちいたアミノ酸は、国産及び輸入品を問わず一流メーカーの特級品を使用した。

$\beta$ オキシマーアミノ酪酸は神戸薬大富田教授の御好意によるものであり  $\epsilon$ -アミノカプロン酸は、鳥取大学医学部精神科教室において合成した<sup>3)</sup> ものである。 $\alpha$ -ケトグルタル酸は和光純薬特級品を使用した。

酵素材料としては、断頭直後速に取り出したニワトリ胚胎新鮮全脳を、pH 7.6  $1/15$  M リン酸緩衝液で10倍のホモジネートとしたものを使用した。なおニワトリは白色レグホン種をもちい 37°C の孵卵器で孵化せしめたものであり、発育中の時期は Standard Stages of Hamburger and Hamilton<sup>4)</sup> に照合するものである。

#### 2) 実験手技

a) Incubation : 1.0 ml のホモジネート、1.0 ml のリン酸緩衝液、0.5 ml のアミノ酸溶液 (75  $\mu$ M) をツンベルグ管主室に入れ、予め中性化した 0.5 ml の  $\alpha$ -ケトグルタル酸溶液 (75  $\mu$ M) を側室に入れ、ガス相は窒素ガスで完全に交換し、ワールブルグ装置を利用し、38°C 水溶液中で10分間予備振盪後、側室の  $\alpha$ -ケトグルタル酸を主室に傾注し、更に 38°C 60分間振盪した。Incubation 後直ちに無水アルコールを加え、蛋白凝固を来すまで充分混合した後、15分間遠沈し完全に除蛋白した上澄液を定量的に採取し、蒸発乾固せしめ、その残渣を水で 1.0 ml の溶液とした。

b) ペーパークロマトグラフィー法による定量及び分離 : 生成されたグルタミン酸をペーパークロマトグラフィーをもちいて分離定量し、トランスアミノナーゼ活性を測定した。東洋濾紙 No. 50に 0.03 ml の Sample を塗布し、一次元上昇法により展開した。溶媒は各アミノ酸の Rf 値を考慮し、ブタノール、醋酸、水 (4.1.1) あるいは 75% 含水フェノールの中分離のよい方をもちいた。しかしながらセリンの場合のみグルタミン酸との分離はいずれも不完全であつた。

フェノール溶媒をもちいた時は、展開終了後、濾紙乾燥しエーテルで洗滌した。

アミノ酸の位置は 0.15% ニンヒドリン水飽和ブタノール溶液を噴霧決定しグルタミン酸に相当する

部位を切り取り、またペーパーだけによる色価を決定するため等面積のブランクも切り取つた。

それぞれの濾紙片を各試験管にとり Fowden<sup>5)</sup>の方法で濾紙表面に吸着されたアムモニアを除去した後、Troll & Cannan<sup>10)</sup>の方法で発色、島津製分光光度計 570 m $\mu$  で比色定量した。

以上の実験手技については Awapara, Seal<sup>7)</sup> 及び住田<sup>8)</sup>の報告を参照した。

### 実験成績

アミノ酸を加えずに  $\alpha$ -ケトグルタル酸だけで組織を incubate しても若干のグルタミン酸が合成されるので、各実験毎にアミノ酸を除外したケト酸単独添加の対照を作り、各アミノ酸のトランスアミネーションはこの価を差引き補正した。以下各表に示す価は、生成されたグルタミン酸からケト酸単独添加の対照で生成されたグルタミン酸の窒素量を Per tube  $\mu\text{g}$  で表わしたものである。またこれらペーパークロマトグラフィーによるグルタミン酸定量の精度を知るため、予備実験として組織にグルタミン酸を附加してその再現を定量した。Per tube 180  $\mu\text{g}$  窒素量のグルタミン酸量を脳ホモジネートに附加し、記載した実験法にしたがつて附加グルタミン酸量を定量した。第1表に示すごとく4例平均105.2%の回収値をえた。またグルタミン酸の1時間、38°C incubation による量的変化を知るため、

第1表 脳組織ホモジネートに附加したグルタミン酸の検出 (4例平均)

附加したグルタミン酸 アミノ窒素量 ( $\mu\text{g}$ )	検出量 *	%
180	189.5	105.2

\* 組織だけによるグルタミン酸量を差引き補正した値

上記の予備実験と同一条件による1時間 incubation 後グルタミン酸量を定量した。第2表に示すように

第2表 脳組織ホモジネートに附加したグルタミン酸の38°C, 1時間, incubation 後の検出 (4例平均)

附加したグルタミン酸 アミノ窒素量 ( $\mu\text{g}$ )	検出量 *	%
180	175.8	97.5

\* 1時間 incubation 後の組織だけによるグルタミン酸量を差引き補正した値

4例平均97.5%回収値をえた。

以上の実験成績でわかるごとく 10  $\mu\text{g}$  Per tube あるいはそれ以下の値は、誤差の範囲である。

1)  $\alpha$ -アミノ酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸とのトランスアミネーション。

第3表はニワトリ胚胎脳各時期について、15種類の  $\alpha$ -アミノ酸と、 $\alpha$ -ケトグルタル酸からのトランスアミネーションをしらべたものであるが、各数

第3表 胚胎脳各時期について、 $\alpha$ -アミノ酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸からのグルタミン酸形成 (3例平均)

アミノ酸	日数							
	8	9	11	13	15	16	17	18
グリシン	4.5	3.7	2.5	4.7	6.7	5.1	7.1	6.5
l-アスパラギン酸	48.8	97.5	127.2	140.8	168.6	247.6	250.1	287.1
dl-アラニン	20.5	25.6	30.6	31.8	36.7	53.1	85.0	100.7
dl-イソロイシン	18.4	20.1	25.2	28.9	30.5	47.5	68.7	78.6
l-ロイシン	5.9	10.2	14.6	20.1	28.4	52.7	64.3	79.7
dl-バリン	2.1	11.6	20.5	27.3	39.4	48.0	48.6	53.1
dl-スレオニン	5.5	—	—	2.7	2.1	3.8	3.7	5.8
pl-ノルバリン	3.7	—	19.8	—	29.9	37.5	47.0	58.0
dl-セリン	4.5	1.9	—	分離不良	"	"	"	"
l-メチオニン	3.7	2.5	—	—	0.0	2.5	—	2.5
l-チロシン	—	—	—	3.8	4.5	10.9	18.5	23.7
l-ヒスチジン	—	—	1.2	—	1.2	—	—	1.5
dl-ノルロイシン	—	0.8	—	—	0.0	0.5	—	0.6
l-プロリン	10.7	—	—	1.1	—	1.5	—	1.0
l-フェニールアラニン	—	1.2	—	0.9	—	2.8	2.7	3.0

単位:  $\mu\text{g}$  per tube

値はそれぞれ3例平均を示すものであり、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、ノルバリン、チロジンなどかなりのアミノ酸に活性をみとめ、かつこれらの値は、他の成熟した動物、例えば、マウス<sup>8)</sup>、イヌ<sup>10)</sup>、カメ<sup>9)</sup>、ナマズ<sup>9)</sup>などに比較すると孵化中とはいえあるいは孵化中でありながらかなりの高値をしめしている。殊にアスパラギン酸などにおいては著しいものがある。

しかしアスパラギン酸、アラニン、イソロイシンの3者は孵化8日目に於てすでにかなりの値を示しているが、その他の活性を示すアミノ酸と共に一律

に孵化15乃至16日目に急激にグルタミン酸形成を増加しつつ孵化当日まで着実にその歩みを進めている。

尚本群では、グリシン、スレオニン、セリン、メチオニン、ヒスチジン、ノルロイシン、プロリン、フェニールアラニンには活性をみとめなかつた。

2)  $\omega$ -アミノ酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸とのトランスアミネーション。

第4表はこの成績をしめす。この群では $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\beta$ -アラニン、 $\beta$ -オキシ $\gamma$ -アミノ酪酸に活性を認め $\epsilon$ -アミノカブロン酸に認めなかつた。

第4表 胚胎脳各時期について $\omega$ -アミノ酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸からのグルタミン酸形成 (3例平均)

アミノ酸	日数	8	9	11	13	15	16	17	18
$\gamma$ -アミノ酪酸		-1.6	12.4	20.1	27.9	35.4	50.7	50.7	56.8
$\beta$ -アラニン		-2.5	-1.0	-1.0	5.8	16.7	27.3	30.5	37.4
$\beta$ -オキシ $\gamma$ -アミノ酪酸		1.8	8.3	10.1	19.8	25.2	32.9	34.2	40.1
$\epsilon$ -アミノカブロン酸		-	-5.8	-	-	2.5	2.5	-	2.0

単位:  $\mu\text{g per tube}$

$\gamma$ -アミノ酪酸についていえば卵生9日目に活性をあらわし、やはり15乃至は16日目においてかなり上昇している。

$\beta$ -オキシ $\gamma$ -アミノ酪酸は、9乃至11日目に活性を認め次第に上昇している。

$\beta$ -アラニンについて云えばさらにおそく、卵生15日目にいたつてようやく有意の値をしめし、漸次増

加している。

比較生化学的にみるとこの群は、前記した $\alpha$ -アミノ酸中活性を示したものがすでに孵化前において相当高値の活性をしめしてはいるが前述した他の諸動物よりかなり低い活性をしめしている。

3) ギーアミノ酸及びシステイン酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸とのトランスアミネーション。第5表は

第5表 胚胎脳各時期について、チアミノ酸及びシステイン酸からのグルタミン酸形成 (3例平均)

アミノ酸	日数	8	9	11	13	15	16	17	18
dl-オルニチン		-5.9	-	1.2	2.9	-	20.7	25.8	25.4
l-リジン		-3.2	0.0	-	-	0.0	0.0	-	0.9
dl-チトルリン		-	-	0.5	-	-	0.7	0.6	0.8
l-アルギニン		-	-	0.0	0.0	0.0	-	-	1.8
l-システイン酸		20.5	37.9	78.1	98.2	127.3	150.0	150.9	178.8

単位:  $\mu\text{g psr tube}$

4種のチアミノ酸とシステイン酸からのトランスアミネーションの成績であるが、オルニチンが、16日目より突然活性をあらわしているほかは、リジン、チトルリン、アルギニンに活性を認めない。

この群で再度強調すべきことは、システイン酸がすでに、8日目において有意の活性をしめし以後かなり急速に上昇し胚胎末期にはすでにマウスなどの

他動物と同様の活性をしめしていることであり、これは著しいことと云わねばならぬ。

以上ニワトリ胚胎脳について各時期をとりあげ、そのおのおのについてトランスアミネーションの成績を表示してきた。8日目から記載したのはおよそこの日までが形態発生の最初の段階であり同時にまた機能活性についても同様なことが云えるにもかか

わらず2~3のアミノ酸を除いてはトランスアミナーゼ反応がほとんど見られないほど低い値であるからである。

### 考 察

個体発生にともなう、細胞学的、形態学的及び機能的な変化を、複雑極らない化学変化の一面として捕捉すると云うことは部分的にはなしえても、それを他の部分に関連づけようとするやがて大きな困難に遭遇するだろう。

生育にともなう諸現象すなわち、蛋白合成生長及び発生を直接にトランスアミナーゼと関係づけよう試みはいずれも成功していない<sup>13)14)15)16)17)18)19)</sup>。

動物の脳はその種類、発達の状態、機能及び細胞構築像の異なるに従つて酵素活性度にも相違が見られるのは勿論である。孵化中のニワトリ胚胎ではその酵素反応において、最も活動的な酵素であり急速に生長する二つの器官すなわち脳と肝とが大なる寄与をするが発生にともなう一連の諸化学事象に *extrahepatic liver* としての卵黄囊の果す役割もまた大きい。孵化最初の12乃至13日までは後になつて肝が生産する代謝産物の大部分を卵黄囊が胚胎に供給するものと思われる。

この器官は胚胎最初の半分の期間において酵素系中の恒常な特異活性を独立して維持するものとされている<sup>22)23)</sup>。

第3表から第5表までに記載した実験成績のうち、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、システイン酸だけが胚胎9日目にトランスアミナーゼ活性を示していることは、この時期が丁度形態発生及び機能活性の最初の期間であり、代謝活性が盛な時であることを考慮に入れると、卵黄囊及び肝がこの期間中アミノ酸代謝の主役をなしているのではないかと思われる。このことは、Rundnick らが胚胎全系、卵黄囊、脳及び肝についてそれぞれの蛋白とグルタモトランスフェラーゼ活性を別々に測定している結果からも肯定出来ることである。すなわち全胚葉系のトランスフェラーゼ活性は胚胎第4日頃より蛋白と共に上昇するが卵黄囊のトランスフェラーゼ活性は蛋白と共に胚胎第4日頃より下降する。胚胎約10日目になるとトランスフェラーゼ活性は60%まで減少している。

脳では初期においては高度の特異活性をしめす肝に比べてトランスフェラーゼ活性は脊髄と共に胚胎最初の半分の時期すなわち形態発生及び機能活動の

最初の時期には最低の活性を示すにすぎないが、第9日乃至第10日目からトランスフェラーゼ活性は次第に上昇し孵化直前までには肝のしめす活性よりやや高くなる。全脳ホモジネートについてしらべたトランスアミナーゼ活性が実験成績に表示した如くほぼ第9~10日頃より有意の値を示し第15~16日より急に上昇することは、Rundnick らのしらべたグルタモトランスフェラーゼ活性のとり行動と比較して興味ぶかいことである。

### 結 論

発育中の各時期におけるニワトリの胚胎脳を用いた量的ペーパークロマトグラフィーを応用して発生生化学の見地から15種の $\alpha$ -アミノ酸、4種の $\omega$ -アミノ酸、4種の $\gamma$ -アミノ酸及びシステイン酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸とのトランスアミナーゼ反応を研究し、発育期のニワトリ胚胎脳における形態発生、機能活動とアミノ酸代謝の関連性を検索した結果は次の如くである。

1) ニワトリ胚胎脳の形態発生及び生長の最初の時期ではただ最小のトランスアミナーゼ活性を示すのみであるが第11日目頃からその活性は次第に着実な増加を示し孵化当日には成熟ニワトリに近い値に達する。

2) アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、ノルバリン、チロジン、オルニチン、 $\beta$ -オキシ $\gamma$ -アミノ酪酸などがトランスアミナーゼ反応に関与するが、このうち、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、ノルバリン、システイン酸などの諸アミノ酸から形成されるグルタミン酸は孵化直前にすでに、マウス<sup>8)</sup>、イヌ<sup>10)</sup>などの他動物と同様の値に達するほどになる。

文 献

- 1) Bruanstein, H. E. : *Advances in Protein chemistry*. **3**, 1 (1947)
- 2) Cohen, P. P. : *The Enzymes*. **1**, 1040 (1951)
- 3) *Organic Synthesis*: 合冊, **II**, **36**, 東京丸善 (1951)
- 4) Hamburger, V. and Hamilton, H. : *J. Morph.* **88**, 49~92 (1951)
- 5) Fowden, L. : *Biochem. J.* **48**, 327 (1951).
- 6) Troll, W. and Cannan, R. K. : *J. Biol. Chem.* **200**, 803 (1953)
- 7) Awapara, J. and Seal, B. : *J. Biol. Chem.* **194**, 497 (1952)
- 8) 住田新平 : 米子医誌, **7**, 306 (1956)
- 9) 今井昭正 : 岡山医誌, **71**巻, 4号 (1959)
- 10) 近藤務 : 生化学, **30**, 447 (1958)
- 11) Rundnick, D. Mela, P. and Waelsch, H. : *J. Exptl. Zool.* **126**, 297 (1954)
- 12) Waelsch, H. : *Biochemistry of The Developing Nervous System*. New York. (1955)
- 13) Cohen, P. P. : in "Symposium Respiratory Enzymes" Univ. Wisconsin. Madison. Wisconsin (1942)
- 14) Braunstein, A. E. : *Advances in Protein chemistry*. **3**, 1 (1947)
- 15) Agren, G. : *Acta. Physiol Scand.* **1**, 233 (1940)
- 16) Albaum, H. G. and Cohen, P. P. : *J. Biol. Chem.* **149**, 19 (1943)
- 17) Cohen, P. P. and Hekhuis, G. L. : *Cancer Research*. **1**, 620 (1941)
- 18) Lindstöm-Lang, K. : *Ann. Rev. Biochem.* **8**, 37 (1939)
- 19) Smith, B. P. and Williams, H. H. : *Arch. Biochem. and Biophys.* **31**, 366 (1951)
- 20) ボールドウイン・動的生化学, 江上等訳, 岩波書店, 東京 (1957)
- 21) Needham, J. : *Perspectives in Biochemistry*. Cambridge (1938)
- 22) Rundnick, D. Mela, P. and Waelsch, H. : *J. Exptl zool.* **126**, 297 (1954)

Amino Acid Metabolism of the Brain. (VII)

Transamination in the Growing Chick Embryo Brain.

By

Tatsuo Yamada

Department of Neuro-Psychiatry Okayama University Medical School.  
(Director; Prof. Nikichi Okumura)

Using the chick-embryo brains in its various developmental stage and by means of paper-chromatography. the author studied transamination of 15 different  $\alpha$ -amino acids, 4  $\omega$ -amino acids, and  $\alpha$ -ketoglutaric acid from embryo-chemical standpoint, and investigated the relationship between the germination, functional activity and amino acid metabolism in the growing chick embryo brains.

The following are the results.

1. In the early stage of chick embryo brain which begins to germinate and develop, only a minimal transaminase activity can be recognized, but on about 11th embryonic day the activity grown gradually and consistently.

On the day of hatching the transaminase activity is almost the same as in a chick.

2. Aspartic acid, alanine, isoleucine, leucine, valine, norvalin, tyrosine, ornithine and  $\beta$ -oxy- $\gamma$ -amino acid, alanine, isoleucine, leucine, valine, norvaline and cysteine immediately before hatching reaches about the same as found in other matured animals such as mouse (8) and dog (10).